中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）45(4)：393～400（1996）

酸楊桃接菌式發酵之研究[1]

楊 淑 惠　王 惠 亮[2]

摘要：由傳統楊桃汁醃漬法中分離之菌種以酵母菌爲主，初步鑑定出 *Candida pelliculosa, C. inconspicua, C. ciferrii, Saccharomy ces cerevisiae* 等，在傳統醃漬過程中，會有少量醋酸產生，其可滴定酸度、草酸、抗壞血酸及胺基態氮等的含量經醃漬後會有較明顯的減少，以接菌式發酵製造之楊桃汁，因發酵時間短，未有醋酸被測得，而其他有機酸、pH 值、酸度、粗蛋白質及胺基態氮等的含量變化並不明顯。糖類在醃漬發在醃漬發酵初期即被大量消耗，到中，後期已無法測得。傳統醃漬楊桃汁的嗜好性品評得分1.0—4.0分不等，接菌式發酵楊桃汁的嗜好性品評得分3.0分。

關鍵詞：酸楊桃、發酵、菌株、接菌、成份。

楊桃汁具清涼退火、潤喉爽聲之功效（本草綱目，李時珍），長久以來在傳統飲料中即佔有一席之地，深受國人所喜愛，在本土食品再出發的研究上，頗受注目。楊桃品種很多，供鮮食之甜味種有二林種、秤錘種及馬來西亞種等，而製成飲用果汁則以酸味種爲主，全省栽植面積爲99.64公頃，包括本地種、五斿頭種等[9]。新鮮酸楊桃的可滴定酸度約爲0.68—1.1%，pH 值在1.37—2.01左右，糖度約在5.5—7.9Bx%左右；糖類主要爲果糖（fructose）、葡萄糖（glucose）和蔗糖（sucrose）；有機酸種類主要爲草酸（oxalic acid）、酒石酸（tataric acid）、蘋果酸（malic acid）、檸檬酸（citric acid）、琥珀酸（succinic acid）、反丁烯二酸（fumaric acid）及戊二酸（ketoglutaric acid）[2,6,9]等。酸楊桃的傳統醃漬法爲：加7-10%食鹽，以一層楊桃一層鹽的方式鹽漬，任其自然發酵（spontaneous fermentation），一般需醃漬約三個月。因每次自然發酵所產生之菌種不儘相同，使得每批次的風味、品質不一，且因滲出液的自然蒸散亦影響原汁收量。方、蔡氏[1,9]由酸楊桃發酵過程中分離、鑑定得知酵母菌菌株有 *Candida hellenicus, C. humicola, C. tropicalis, C. dattile, C. golbosa, C. krusei, C. magoliae, Cryptococcus neoformans* 及 *Hanseniaspora gerilliermondii* 等十種酵母菌株，蔡氏[9]以人爲嗅覺做爲香氣之官能評估，結果以 *C. humicola, C. pelliculosa, C. steatolytica, Kluyveromyces thermotloeran*及混合接種所呈現之香氣較佳。王[4]之研究，將酵母菌（Y—4）接種於新鮮楊桃汁，進行通氣及嫌氣發酵，僅需三至四天即可得發酵楊桃汁，風味頗佳。本試驗擬採控制發酵（controlled fermentation）方法，自行由傳統之自然發酵中分離優良菌株，經鑑定、馴化後，以接入純種（pure culture）或二種以上菌株方式進行酸楊桃純培養（pure culture）發酵，取代傳統之自然發酵，期能篩選出優良菌株，應用於實際生產，縮短發酵時間，維持產品之一定品質，並將此技術提供農戶及食品業者參考。

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1874 號。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所助理、副研究員兼系主任。臺灣省　高雄縣　鳳山市。

材料與冰塊

一、試驗材料

以屏東縣鹽埔鄉九分熟以上之酸味楊桃（*Averrhoa caramola L*）果實爲試驗材料，分別採集八十四年夏季果及八十五年冬季果。

二、試驗方法

(一)楊桃汁製作方法：

1. 傳統發酵法：

酸味種楊桃經洗滌、瀝乾後稱重。將楊桃鋪平在圓桶內 ，灑上一層鹽。鹽總重爲楊桃總重的７％，如此一層楊桃一層鹽覆蓋竹網 ，並壓上重物 ，以便汁液滲出時，楊桃不致浮出液面感染雜菌 ，圓桶置於遮蔭通氣良好處 ，總計醃漬三個月，醃漬期間每二星期取樣分析一次。

2. 接菌發酵：

(1)菌種分離與鑑定

於不同時間取樣之楊桃原汁，塗佈於 PDA 上，逢機挑取10個單一酵母菌菌落移至 YM agar中，於25°C培養二天，進行酵母菌細胞型態特性分類做初步鑑定，酵母菌純化後，以 bioMerieux Vitek 公司生產之 api20C AUX，依其鑑定手續，於 YM aga 培養18至24小時內進行鑑定。再以 Biolog 生產之 YT MicroPlate 依其鑑程續，先以 BUY 培養18至 24小時內進行鑑定。

(2)菌液

取80ml 新鮮酸楊桃汁，加入３％鹽，經90°C加熱三分鐘，放冷後接入篩選出之優生菌株（共４株），於28～30°C以 100r.p.m. 振盪培養 24小時。

(3)試驗組

1.5升新鮮酸楊桃汁經加３％鹽、滅菌、冷卻後，接入已培養24小時之菌液（菌液濃度6×10^5，接種量５％），於28—30°C，以100r.p.m. 振盪培養，經發酵五天後完成，發酵期間每日固定時間取樣分析。

(二)分析項目：

供試驗分析之楊桃汁，除了新鮮楊桃汁是從新鮮楊桃壓榨而得，其後之楊桃汁皆取自醃漬後自然滲出汁液或發酵液。

1. pH 值：以 pH meter 測定。
2. 可滴定酸度測定：取 5g 樣品加入10倍去離子水，以0.1N 氫氧化鈉滴定至 pH8.2。以草酸爲計算標準。
3. 有機酸分析[12]：楊桃滲出汁液，經離心後以0.45μm 濾過處理後，以日立高效液相層析儀測定，分離管 Aminex HPX-87H，管溫40°C，UV 偵測器210nm，流動相0.01N H_2SO_4，將結果與對照組比較，做有機酸鑑定，定量則與對照組面積比較換算。
4. 糖類分析[12]：樣品處理同上，以日立高效液相層析儀測定，分離管爲 Aminex HPX-87H，管溫43°C，RI 偵測器，流動相爲 0.01NH_2SO_4，鑑定及定量方法與有機酸相同。
5. 粗蛋白質測定[3]：取適量樣品於消化管中，加入催化劑及濃硫酸於氮分解爐中加熱分解，冷卻後蒸餾，以硼酸液收集蒸餾液，收集液以 0.1NH_2SO_4 滴定。每 ml0.1N 硫酸＝1.4006mg 之氮，以總氮量 ×6.25計算。
6. 胺基態氮測定：依中國國家標準 CNS 總號12630方法。

7. 生菌數之檢驗：依中國國家標準 CNS 總號10890方法，以 PCA 及YM ager 爲培養基，於30°C培養 2 — 3 天後計算菌落數。
8. 糖度：取澄淸原液，以 ATAGO PR1 數字式糖度計測定。
9. 抗壞血酸測定：取適量樣品，加入偏磷酸溶液中，以2,6-Dichloropgenol indophenol-Na 滴定至粉紅色。
10. 菌種鑑定：以 bioMerieux Vitek 公司生產之 api20C AUX 及由 Bio log 生產之 YT MicroPlate 鑑定。
11. 風味品評：評定項目爲色澤、香氛、味道及總接氣性，品評員爲本分所分析室固定10人，品評樣品爲發酵完成之酸味楊桃滲出液，經過濾、殺菌加入糖度 100 Brix之糖水，依一比四比例稀釋，以20°C之溫度供品評，經品評定所得之評分。
   1分：很差　2分：差　3分：尙可　4分：好　5分：很好

結果與討論

本次供試（屏東縣鹽埔鄉）之新鮮酸楊桃的可滴定酸度約爲0.73%，pH 值在1.7左右，糖度爲 6.3^0 Brix，糖類主要爲果糖和葡萄糖，總糖含量約爲4.83g%，有機酸種類主要爲草酸，蘋果酸、琥珀酸及檸檬酸次之，總有機酸含量爲0.91g%。酸楊桃醃漬低糖酸又添加食鹽的發酵環境，在此情況下微生物相的種類已被自然篩選，本試驗由傳統醃漬楊桃汁中所分離出的菌種主要爲酵母菌，初步鑑定出 *Candida. pelliculosa, C. inconspicua, C. ciferrii, Saceharomyce s cerevisiae* 等四株菌，外型爲圓型及長橢圓型，大小（2 — 3）×（2 — 5）μm，如圖 1 所示，其中 *S. cerevisiae* 爲常見之酒精發酵菌，而以 *C. ciferrii* 菌株之活力最旺盛，經30°C48小時盪培養菌數可達10^8 CFU/ml，且該菌株爲中、後段醃漬的優勢菌。四株菌單一接種、發酵的風味頗爲相似，惟均較淸淡，爲使楊桃接菌式發酵的風味更近以傳統醃漬楊桃的味道，本試驗採混合接菌法，將四株菌同時加入，於室溫中振盪發酵。

一、一般成份變化

蔬果經醃漬後成份常有消長，表 1 爲酸楊桃以傳統醃漬法或接菌式發酵法發酵期間一般成份含量變化情形。酸楊桃以接菌式發酵法發酵，因發酵時間短，其發酵液之各項成份含量變化不明顯，酸度含量在0.68—0.72g%之間、pH 值在1.4—1.6左右、粗蛋白質含量約在0.14—0.17g%之間、胺基態氮含量則由 22.9mg/100g 微幅下降至 18.2mg/100g。以傳統醃漬法發酵者，其發酵液之 pH 值在2.0—1.8左右、粗蛋白質含量約在0.14—0.17g%之間，醃漬期間變化並不顯著，酸度則會由醃漬前的0.73g%漸漸下降至0.37g%，且前段下降幅度較中、後段明顯，此結果與前報相似[7]，胺基態氮含量會隨醃漬時間延長由22.89mg/100g 巨幅下降至8.98mg/100g。由於胺基態氮含量是 CNS 蔬果汁成份檢測上的檢驗項目，亦是食品廠收購發酵楊桃原汁的標準之一，故影響該成份之因素是品種、環境或微生物菌相等則有待深入探討。

二、糖類及有機酸含量變化

酸楊桃之糖類主要爲果糖、葡萄糖和蔗糖[6,7,8]，本次供試驗之酸楊桃，爲屏東縣鹽埔鄉地區性品種，其總糖含量約爲4.83g%，以葡萄糖及果糖爲主，蔗糖則無法測得，此現象可能與品種或成熟度有關，有等再進一步調查。糖類在醃漬發酵初期即被大量消耗，以傳統方式醃漬者，在第一、二週期間葡萄糖、果糖消耗率分別爲80%、72%，第八週後已無法測得。接菌式發酵初期葡萄糖消耗率高達90%；果糖消耗率爲62%，發酵至第四天葡萄糖已無法測得，果糖則仍有0.16g%的含量，如表 2 所示，傳統醃漬法或接菌式發酵法之糖類消耗情形頗爲相似，葡萄糖被消耗的速率比果糖快，亦較先被耗盡，此結果與 Cancalon[10] 對柳橙汁所做試驗報告相似。若以碳源耗盡爲發酵完成之指標，則傳統醃漬長達三個月的發酵似乎是可被縮短的，是否爲風味熟成之考量有待探討。

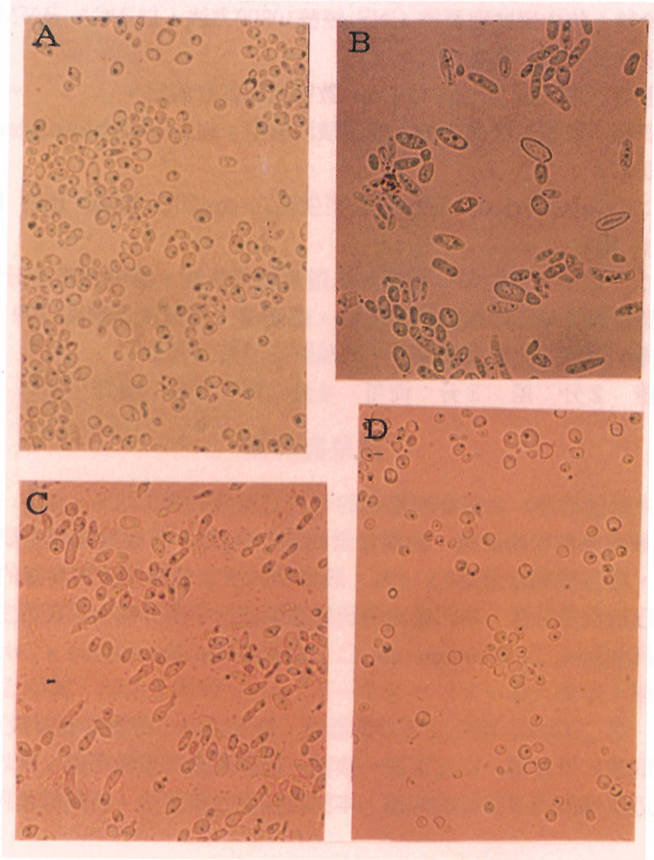

圖1. 由酸楊桃醃漬液分離出之酵母菌菌株

Fig. 1. Yeast strains observed under microscop x 400 from the exduate of tart carambola.
A : *Candida pelliculosa* B : *C. inconspicaua*
C : *C. ciferrii* D : *Saccharomyces cerevisiae*

表1. 酸楊桃經傳統醃漬法與接菌發酵法之一般成份含量變化

Table 1. Changes of composition of carambola fermentated by traditional and inoculating methods

Traditional method					Inoculating method				
Fermentation (day)	Titratble acidity %	pH value	Crude protein g%	Amino nitrogen mg/100g	Fermentation (day)	Titratble acidity %	pH value	Crude protein g%	Amino nitrogen mg/100g
0	0.73	1.7	0.16	22.9	0	0.72	1.6	0.16	22.9
14	0.37	2.0	0.15	16.1	1	0.69	1.5	0.17	20.2
28	0.39	2.0	0.15	15.8	2	0.70	1.5	0.16	20.8
42	0.37	1.8	0.16	13.6	3	0.68	1.4	0.16	21.0
56	0.38	1.9	0.15	12.9	4	0.70	1.4	0.15	20.1
70	0.36	1.7	0.15	11.4	5	0.70	1.4	0.14	18.2
84	0.36	1.8	0.14	8.9	—	—	—	—	—

酸楊桃的有機酸種類主要爲草酸、酒石酸、蘋果酸、檸檬酸、琥珀酸、反丁烯二酸及戊二酸[4,7,8,9]等，本次供試之酸楊桃其有機酸種類主要爲草酸、蘋果酸、琥珀酸。酸楊桃經傳統醃漬法發酵第二週後，會有醋酸產生，含量約0.08g%。大多數的有機酸會被微生物利用而減少[9]，以草酸、蘋果酸及抗壞血酸含量爲例，其草酸含量由0.72%下降至0.40g%左右，減少了44%，蘋果酸含量由

0.089%減少為0.032g%，抗壞血酸含量明顯由12.3mg/100g減少為6.5mg/100g。而接菌式發酵法發酵者，其草酸含量則下降至0.64g%，減少11%，蘋果酸含量及抗壞血酸含量則分維持在0.1g%至0.09g%及11～12mg/100g 之間，變化不明顯，如圖2、3。

表2. 酸楊桃經傳統醃漬法與接菌發酵法之醣類含量變化

Table 2. Changes of sugar content of carambola fermentated by traditional and inoculating methods

Traditional method				Inoculating method			
Fermentation (day)	Glucose %	Fructose %	Sucrose %	Fermentation (day)	Glucose %	Fructose %	Sucrose %
0	1.581	3.251	ND[z]	0	1.581	3.252	ND
14	0.332	0.891	ND	1	0.158	1.250	ND
28	0.028	0.137	ND	0	0.067	0.488	ND
42	0.017	0.085	ND	0	0.030	0.269	ND
56	ND	ND	ND	4	ND	0.160	ND
70	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND
84	ND	ND	ND	—	—	—	—

[z]ND：Not detected

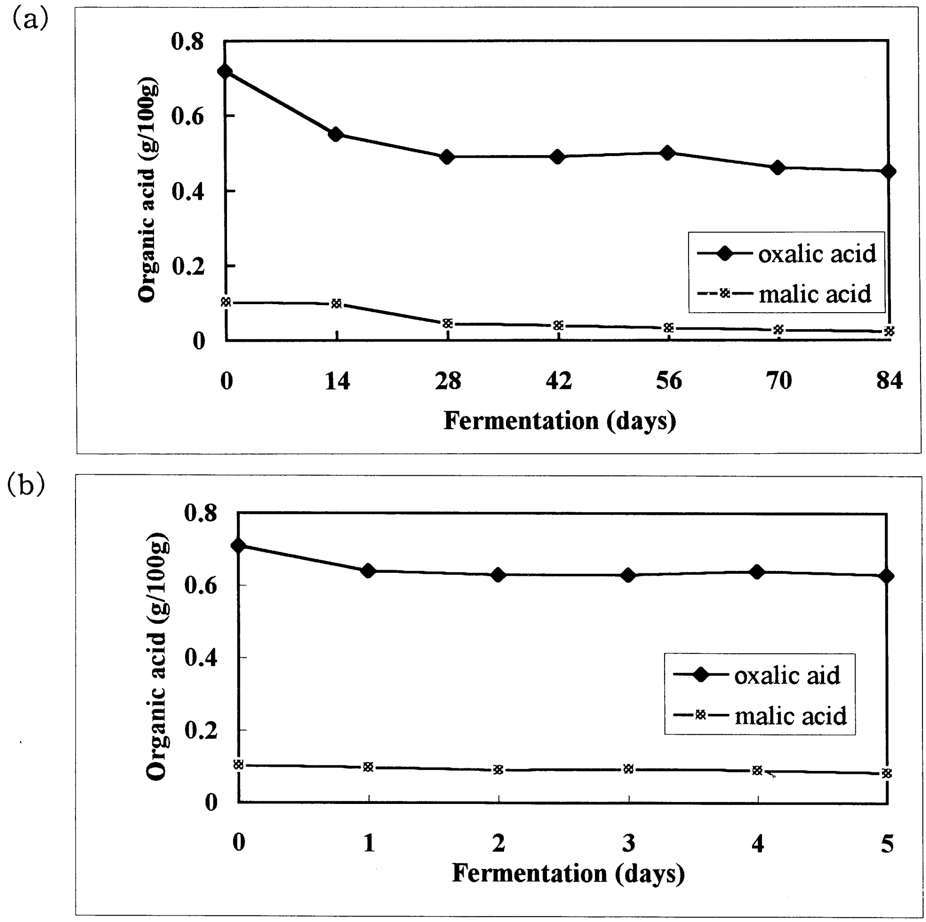

圖2. 酸楊桃於(a)傳統醃漬法與(b)接菌式發酵期間之有機酸變化

Fig. 2. Changed of organic acid of carambola fermentated by (a) traditioal pickled method and (b) inoculating method.

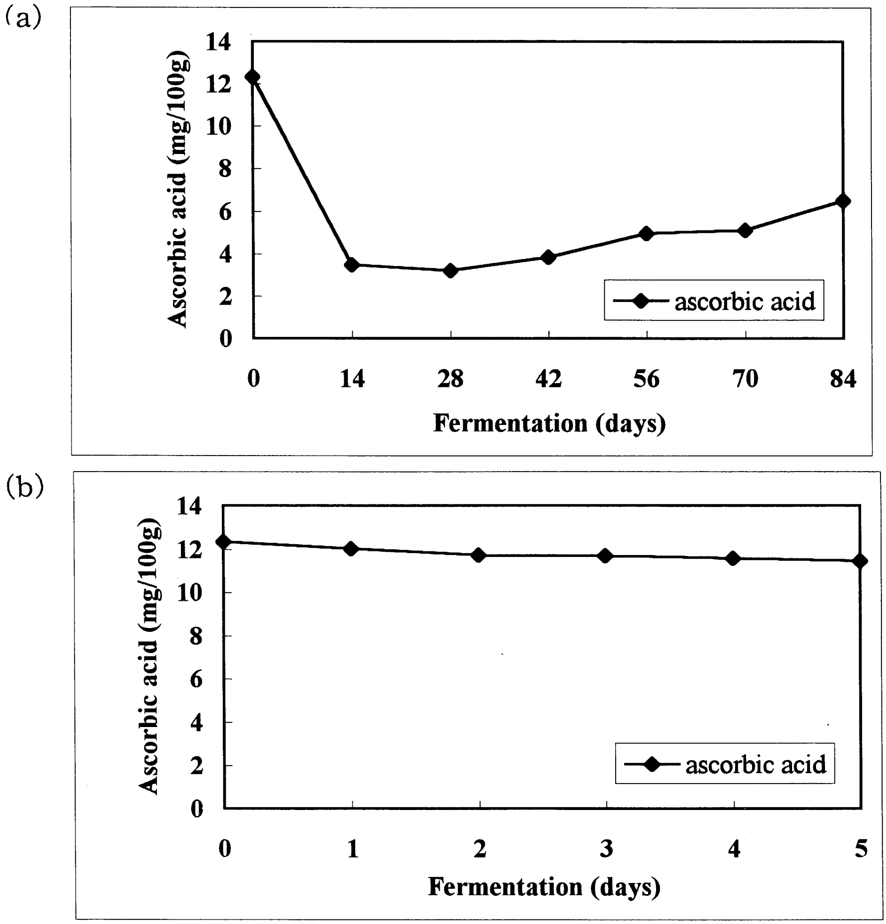

圖3. 酸楊桃於(a)傳統醃漬法與(b)接菌式發酵期間之抗壞血酸含量變化

Fig. 3. Changed of ascorbic acid contents of carambola fermentated by (a)traditioal pickled method and(b)inoculating method.

三、稀釋果汁品評

將收集之不同批次傳統醃漬楊桃果汁，及接菌式發酵楊桃果汁，以相同比例加糖水稀釋，由十名人員品評。品評結果如表 3 所示，接菌式發酵果汁的品評得分均在2.5～ 3 分左右，傳統醃漬果汁的品評得分則由 1 ～ 4 分不等。接菌式發酵果汁在口感上，澀味較傳統醃漬果汁重，風味上較清淡，且其香氣亦與傳統醃漬果汁不相同。傳統醃漬果汁風味濃郁，惟每批之色澤、香氣不同，亦有些批次因氣味不佳而品評得分較低者。故整體而言，接菌式發酵的品質尚稱良好，若在風味菌株選用、發酵時間再延長，以便增加草酸等酸類之消耗量等方面再做改進，製造出富於香氣、品質穩定的發酵楊桃汁是可以期待的。

依王氏[4]、蔡氏[9]之報告，以傳統方法或接菌方式發酵酸楊桃，都會有醋酸產生，含量最高可達0.23g%；前報[7]之傳統醃漬法亦有約0.1g%的醋酸產量，惟本次接菌方式發酵試驗並未測得有醋酸存在，推測可能是含量太低無法測得，或與菌株種類有關，依方氏、蔡氏[1,9]分離之酵母菌菌株有 *Candida hellenicus, C. humicola, C. tropicalis, C. dattile, C. golbosa, C. krusei, C. magoliae, Cryptococcus neoformans* 及 *Hanseniaspora gerilliermondii* 等十種酵母菌株，均與本次試驗所

分離出之菌株不盡相同，依 Pederson[11]之報告，溫度及鹽量會影響泡菜醃漬之菌相，是否爲菌相差異所致則有待再深入探討。

表3. 楊桃汁傳統醃漬法及接菌式發酵之官能品評

Table 3. The sensory evaluation of carambola juice fermentated by traditional and inoculating methods.

Method	Sensory evaluation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total score
Traditional	2	4	3	2	1	2	2	1	2	3	22.0
Inoculating	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	27.0

n=5

引用文獻

1. 方祖達。1993。生物技術在果汁加工上的一些應用。生命科學簡訊 7(5)：9—13。
2. 方祖達、蔡榮哲。1993。楊桃果汁檢驗標準之研究。臺大農學院研究報告 33(3)：151—163。
3. 中國國家標準。1982。食品中粗蛋白質之檢驗法。總號 5035。
4. 王孟雲。1985。醃漬楊桃加工過程中之化學變化。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
5. 侯宗榮等。1977。由不同品種及成熟果實製成之果汁中不揮發性有機酸組成之研究 1. 楊桃汁、木瓜汁及百香果汁。食品科學 4(2)：11—24。
6. 侯宗榮等。1978。品種及成熟度對果汁成分影響之研究一木瓜汁及百香果汁。中國農業化學會誌 16(1—2)：14—23。
7. 游若萩、王武彰。1987。楊桃之品質成分與加工利用之研究。中華農業研究 36(2)：196—206。
8. 楊淑惠、王惠亮、王武彰。1995。酸味楊桃醃漬過程中有機酸及糖類變化研究。中華農業研究 44(2)：135—146。
9. 蔡榮哲。1995。傳統式楊桃汁加工醃漬過程中品質、化學成分及菌相之研究。第177頁。國立臺灣大學園藝學研究所博士論文。
10. 臺灣楊桃產業調查。1993。臺灣省政府農林廳編印。臺中。
11. Canaclon, P. F. and Parish, M. E. 1995. Changes in the chemical composition of orange juice during growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Ghuconobacter oxydans*. Food microbiol. 12(2)：117—124。
12. Guide to Aminex(R) Bop-Rad HPLC columns. 1994。
13. Pederson, C. S. and Albury, M. N. 1954. The influence of salt and temperature on the microflora of sauerkraut fermentation. Food Technol. 8：1-5.

Studies on Tart Carambola Fermentation with Inoculating Method[1]

Shu-Hui Yang and Hui-Liang Wang[2]

Summary

Yeasts were the major microbes in carambola traditional pickled method. They are *Candida pelliculosa, C. inconspicua, C. ciferrii* and *Saccharomyces erevisiae.*
During the traditional pickled process, a small mounts of acetic acid was appeared. Titratable acidity, oxalic acid, ascorbic acid and amimo nitrogen contents decreased significantly after pickled by traditional method. However, fermentation by inoculating method acetic acid could not be detect and titratable acidity, oxalic acid and amimo nitrogen contents didn't change too much also. Most of sugars were rapidly metabolized by the micrboes during the early stage of fermentation, therefore, it is unabled to detect at middle and final stages. The sensory evaluation scores of traditional and inoculating methods were from 1.0 to 4.0, and 3.0, respectively.

Key words : Tart carambola, Fermentation, Strain, Inoculating, Copmposition.

1. Contribution No. 1874 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Assistant, Associate scientist of Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station, TARI, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan, ROC.